

Determinación de la capacidad fumonigénica de aislados de *Aspergillus niger* provenientes de diferentes sustratos

Yessica Ochoa*, Marleny Chavarri, Claudio Mazzani y Nohants Rumbos

¹Laboratorio de Micotoxicología, Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apto. 4579. Maracay 2101. Aragua. Venezuela

RESUMEN

Algunos aislados de *Aspergillus niger* tienen la capacidad de producir ocratoxina A, pero estudios recientes demuestran que también pueden sintetizar fumonisinas, especialmente fumonina B2, consideradas como posibles carcinógenos de humanos y causantes de diferentes patologías en animales. Por esta razón, se determinó la capacidad fumonigénica de aislados de *A. niger* provenientes de diferentes sustratos (maíz, arroz, girasol, maní y caraota), en los cuales se ha detectado una alta incidencia de este moho. Los aislados de maíz, arroz y girasol fueron obtenidos de la colección de mohos del Laboratorio de Micotoxicología, UCV, mientras que los aislados de maní y caraota se obtuvieron mediante la siembra directa de granos enteros y desinfectados sobre el medio malta sal agar. La determinación y cuantificación de fumonisinas (B1+B2+B3) se realizó mediante el uso de columnas de inmutofinidat (Fumonitest, Vicam) y fluorometría. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado constituido por cinco tratamientos con cuatro replicas. Todos los aislados de *A. niger* sintetizaron fumonisinas, pero no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, la presencia de fumonisinas en estos sustratos representa un peligro potencial para la salud a nivel mundial, debido a que son compuestos acumulativos. Además, *A. niger* es un contaminante habitual de diversos sustratos y algunas cepas son utilizadas en procesos biotecnológicos para la producción de ácidos orgánicos, enzimas, proteínas, entre otros.

Palabras clave: arroz, caraota, fumonisinas, girasol, maíz, maní.

Determining the fumonigenic ability of *Aspergillus niger* isolates from different substrates

ABSTRACT

Some *Aspergillus niger* isolates have the ability of producing ochratoxin A, but recent studies have shown that they can also synthesize fumonisins, especially fumonisin B2, considered as possible human carcinogen and the cause of different pathologies in animals. For this reason, the fumonigenic capacity of *A. niger* isolates from different substrates (corn, rice, sunflower, peanut and black beans) was determined because it has been detected in these substrates a high incidence of this mold. Isolates from maize, rice and sunflower were obtained from the Laboratory of Mycotoxicology, Faculty of Agronomy, UCV, while peanut and beans isolates were obtained by direct seeding of whole grains and disinfected on malt salt agar medium. Identification and quantification of fumonisins (B1+B2+B3) was performed using immunoaffinity columns (Fumonitest, Vicam) and fluorometry. A completely randomized design consisting

*Autor de correspondencia: Yessica Ochoa

E-mail: ydos_17@hotmail.com

of five treatments with four replications was used. All isolates of *A. niger* synthesized fumonisin, but no significant differences were detected between treatments. However, the presence of fumonisin in these substrates represents a potential danger to health globally, because they are cumulative compounds. Additionally, *A. niger* is a common contaminant of various substrates and some strains are used in biotechnological processes for the production of organic acids, enzymes, proteins, among others

Key words: black beans, fumonisins, maize, peanuts, rices, sunflower

INTRODUCCIÓN

Aspergillus niger van Tieghem es una especie cosmopolita que se ha detectado contaminando diferentes productos alimenticios como semillas de girasol, leguminosas, granos de arroz, café verde, té negro, cebolla, manzanas, frutos secos, entre otros (El-Wakil, 2014; Makun et al., 2011). Industrialmente, algunas cepas son utilizadas en diferentes procesos como producción de ácidos orgánicos, producción de enzimas extracelulares, biotransformación de xenobióticos, biorremediación, pretratamiento de residuos, obtención de proteínas, entre otros, gracias a su estatus GRAS (generally recognized as safe) otorgado por la FDA (Frisvad et al., 2011).

Ciertas cepas de *A. niger* tienen la capacidad de sintetizar ocratoxina A. Sin embargo, estudios recientes señalan que algunas cepas de este moho también sintetizan fumonisinas, por lo que diversos alimentos y piensos pueden potencialmente contener dos tipos de micotoxinas carcinogénicas sintetizadas por esta especie (Grau et al., 2011). La mayor incidencia y diversidad de fumonisinas sintetizadas por *A. niger* se ha encontrado en uvas y derivados (pasas y vino), detectándose fumonisinas B₂, B₄ y B₆, siendo la más frecuente la fumonisina B₂ (Mogensen et al., 2010). Además, se ha comprobado la contaminación con fumonisinas en otros productos alimenticios como maní (Palencia et al., 2010), maíz (Logrieco et al., 2014) y café (Paramee et al., 2009).

Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad fumonigénica de aislados de *Aspergillus niger* provenientes de diferentes sustratos (arroz, maíz, girasol, maní y caraota) donde se ha detectado una alta incidencia de la especie, siendo éste el primer estudio realizado en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislados

Los aislados de *Aspergillus niger* provenientes de los sustratos de arroz (*Oryza sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.) y girasol (*Helianthus annuus* L.) fueron suministrados por el Laboratorio de Micotoxicología

del Instituto de Química y Tecnología, ubicado en la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. Estos aislados fueron caracterizados molecularmente en estudios anteriores (Chavarri, 2010, comunicación personal), mientras que los aislados de granos de maní (*Arachis hypogaea* L.) y caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) fueron obtenidos mediante el método de siembra directa sobre el medio malta sal agar (MSA), cuya composición proximal fue 10 g de agar extracto de malta, 60 g de NaCl y 15 g de agar por litro de agua destilada, ajustándose el pH a 5,8.

Para el aislamiento se seleccionaron 100 granos enteros de cada sustrato (maní y caraota) que fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5% (NaClO) durante 30 seg y lavados tres veces con agua destilada estéril. La siembra se realizó en placas Petri a razón de 12-13 granos/placa, incubándose durante 8 d bajo condiciones de laboratorio con alternancia de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, a una temperatura promedio de 27°C y una humedad relativa de 60 a 65% (Mazzani, 2012; Narcise, 2009).

Cumplido el tiempo de incubación, se purificó el moho transfiriendo con una aguja de siembra esterilizada una pequeña porción de la colonia a tubos de ensayos contentivos del medio papa dextrosa agar (PDA) a pH 5,8, incubados a temperatura ambiente durante 8 d (Mazzani et al., 1999). De igual forma, se procedió para la reactivación de los aislados de arroz, maíz y girasol sobre el medio PDA. Posteriormente, todos los aislados fueron conservados a baja temperatura (15°C) hasta el momento de la producción de fumonisinas sobre el medio a base de arroz.

Identificación de los aislados obtenidos

La identidad de los aislados obtenidos a partir de maní y caraota se confirmó a través de la caracterización macroscópica de la colonia desarrollada en el medio Czapek Agar (pH 5,8), a partir de la cual se hicieron preparados microscópicos para realizar el estudio morfológico de las estructuras con valor taxonómico para compararlos con las claves micológicas y con los valores obtenidos en la literatura especializada (Samson et al., 1995; Singh et al., 1991).

Preparación del medio natural a base de arroz

El medio a base de arroz utilizado para la producción de fumonisinas se preparó según la metodología descrita por Palma (1996) y Homsí (2002), quienes comprobaron que este sustrato es ideal para el crecimiento fúngico y la consecuente producción de la toxina, debido a su composición bromatológica. Para ello, se pesaron 50 g de arroz en un matraz Erlenmeyer (250 mL) y se añadieron 50 mL de agua destilada, luego se esterilizó dos veces en un autoclave a vapor abierto a 120°C durante 15 min.

Producción de fumonisinas

El medio a base de arroz fue inoculado con 1 mL de la suspensión de esporas obtenida de cada uno de los aislados de *A. niger*, ajustada a una concentración de $2,0 \pm 0,5 \times 10^6$ esporas/mL en una cámara de Neubauer. Para ello, se incorporaron 10 mL de agua destilada estéril en cada uno de los aislados de *A. niger* cultivados en tubos de ensayos contentivos del medio papa dextrosa agar durante 8 d. Con una aguja de siembra esterilizada, se removió la colonia del moho y la suspensión obtenida fue filtrada a través de gasa esterilizada para obtener la suspensión de esporas a inocular. El arroz inoculado fue incubado a temperaturas de $28 \pm 5^\circ\text{C}$ por un periodo de 15 d alternando 12 horas luz y 12 horas oscuridad, luego se sometió a baja temperatura (15°C) bajo oscuridad continua por un periodo de 15 d (Mazzani *et al.*, 2008).

Determinación y cuantificación de fumonisinas

Para la determinación de la capacidad fumonigénica de los aislados de *A. niger* se utilizó el método inmunoquímico Fumonitest (VICAM Science Technology, EUA), fundamentado en la utilización de columnas monoclonales específicas para la detección de fumonisinas B_1 , B_2 y B_3 . Se cuantificó el contenido de fumonisinas ($B_1+B_2+B_3$) a través de un fluorómetro (BBI Source Scientific Inc. VICAM, EUA), previamente calibrado según lo recomendado por el fabricante.

Para la extracción de las fumonisinas, se homogenizaron 50 g de arroz enmohecido con 5 g de sal (NaCl) y 100 mL de solución metanol (80:20) en una licuadora durante 1 min. El extracto obtenido se hizo pasar por un proceso de filtrado que inicio con papel Whatman N°1, luego se tomaron 5 mL de este primer filtrado y se mezcló con 40 mL de buffer de lavado para ser filtrado a través de papel microfibras de vidrio. Posteriormente, se tomaron 10 mL del segundo filtrado y se colocaron en una jeringa de vidrio para ser pasados gota a gota a través de la columna de inmovilización.

Transferidos los 10 mL del extracto, se procedió al lavado de la columna con 10 mL de buffer de lavado, 10 mL de buffer fosfato (PBS) + Tween 20 y 10 mL de agua destilada estéril. Luego, se añadió 1 mL de metanol grado HPLC para extraer las fumonisinas, recogiénolas en un tubo de borosilicato. Finalmente se agregaron los reveladores (0,5 mL de OPA y 0,5 mL de 2-mercaptoetanol) y se analizó la fluorescencia de la micotoxina a través del fluorómetro, reportando la concentración de fumonisinas ($B_1+B_2+B_3$) en ppm (mg/kg) (Mazzani *et al.*, 1999; Scott y Trucksess, 1997; Trucksess, 1996).

Tratamiento estadístico

Para determinar la capacidad fumonigénica de los aislados de *A. niger* provenientes de diferentes sustratos, se empleó un diseño completamente aleatorizado constituido por cinco tratamientos (T), los cuales se describen a continuación: T1: *A. niger* aislado de granos de maíz (ANM), T2: *A. niger* aislado de granos de arroz (ANA), T3: *A. niger* aislado de semillas de girasol (ANG), T4: *A. niger* aislado de granos de caraota (ANC), T5: *A. niger* aislado de granos de maní (ANN), con cuatro repeticiones cada uno para un total de 20 observaciones. Los resultados obtenidos fueron analizados a través del programa SPSS Statistics (SPSS, 2008), mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. niger se caracterizó por la formación de colonias de color negro por la parte superior con un reverso de color crema muy claro. El diámetro promedio para el aislado de maní fue de aproximadamente 4,9 cm mientras que en el aislado de caraota fue de 4,3 cm. A nivel microscópico, se observaron abundantes conidios globosos de color negro y pared gruesa (Figura 1). La cabeza conidial era globosa y pigmentada con presencia de mótulas y fiálides, la cual se encontraba unida a un conidióforo largo e hialino de pared lisa, coincidiendo las mediciones de cada estructura con lo establecido en los manuales de identificación micológica de Samson *et al.* (1995) y Singh *et al.* (1991).

Todos los aislados de *A. niger* sintetizaron fumonisinas ($B_1+B_2+B_3$). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Numéricamente, el aislado proveniente de girasol presentó mayor capacidad fumonigénica con 5,4 ppm seguido por los aislados de caraota, maíz, maní y arroz (Cuadro 1).

Por otra parte, al comparar la esporulación de los diferentes aislados de *A. niger* inoculados en el medio a

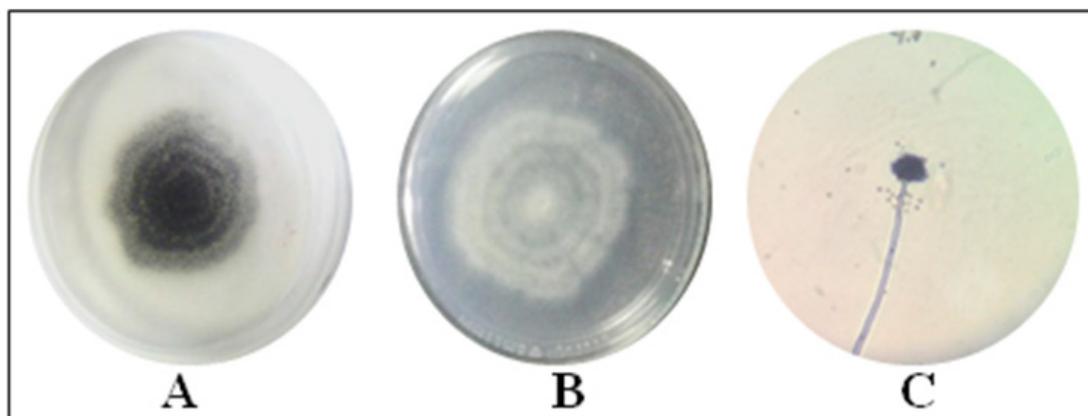


Figura 1. Caracterización macroscópica y microscópica del aislado de *Aspergillus niger* proveniente de granos de maní. Colonia aislada sobre el medio Czapek agar (A) Cara superior, (B) Cara inferior, (C) Vista al microscopio óptico a 1000X.

base de arroz, se observó que el aislado de maíz fue el que presentó menor esporulación durante los primeros 15 d de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, fue el tercer aislado con el valor promedio de fumonisinas totales más alto, lo que coincide con una investigación realizada en cepas de *A. niger* utilizadas con fines industriales, donde no se encontró correlación entre la cantidad de esporulación y la producción de fumonisinas (Frisvad et al., 2011).

Desafortunadamente existe muy poca información sobre la legislación de fumonisinas en diferentes productos alimenticios; sólo se han establecido límites permisibles para el maíz y sus derivados, debido a su alta contaminación con fumonisinas asociadas principalmente a la presencia de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg que es considerado como el principal productor de esta micotoxina (Chavarri et al., 2009).

El Reglamento N° 1881/2006 de la Comisión Europea (Unión Europea, 2006) establece como límite máximo de fumonisinas (B_1+B_2) en maíz no elaborado

Cuadro 1. Síntesis de fumonisinas *in vitro* por cinco aislados de *Aspergillus niger* provenientes de diferentes sustratos.

Aislado ¹	Fumonisininas $B_1+B_2+B_3$ (ppm)
ANG	5,4
ANC	3,4
ANM	3,3
ANN	3,1
ANA	2,4

¹AN: *Aspergillus niger* aislado de G (Girasol), C (Caraota), M (Maíz), N (Maní) y A (Arroz)

2000 ppb, mientras que en los subproductos del maíz (harina, maíz molido, maíz triturado, germen y aceite refinado) el límite máximo permitido es 1000 ppb. En el caso de los alimentos a base de maíz destinados al consumo humano directo, a excepción de los mencionados anteriormente, el límite máximo es 400 ppb y para los grupos más susceptibles, como los niños de corta edad y los lactantes, lo máximo permitido es 200 ppb.

Por lo tanto, todos los aislados de *A. niger* bajo estudio excedieron los límites de tolerancias permitidos, lo que representa un grave peligro para la salud, ya que, las fumonisinas son acumulativas y en presencia de otras micotoxinas ejercen un efecto sinérgico que puede causar diferentes patologías (Chavarri et al., 2012).

Los niveles de fumonisinas detectados en el aislado de maní coinciden con los reportados en muestras de maní provenientes de Tailandia donde la producción de fumonisinas osciló entre 0,22 y 9,4 ppm (Mogensen, 2011). Se ha comprobado que algunos aislados de *A. niger* tienen la capacidad de crecer en forma endófito en semillas de maíz y maní sin mostrar una sintomatología aparente. Asimismo, se demostró que dichos aislados tenían la capacidad de sintetizar micotoxinas, produciendo mayor cantidad de ocratoxina A (20%) que fumonisinas totales (10%) (Palencia et al., 2010).

En granos de maíz, los contenidos de fumonisinas detectados en muestras provenientes de tres regiones de Brasil (Beira Litoral, Ribatejo y Alentejo Alto) oscilaron entre 1 y 5382 ppb (Soares et al., 2013), mientras que en maíces provenientes del centro de Italia, los contenidos de fumonisinas se encontraron entre 0,04 y 13,2 ppb (Logrieco et al., 2014), siendo

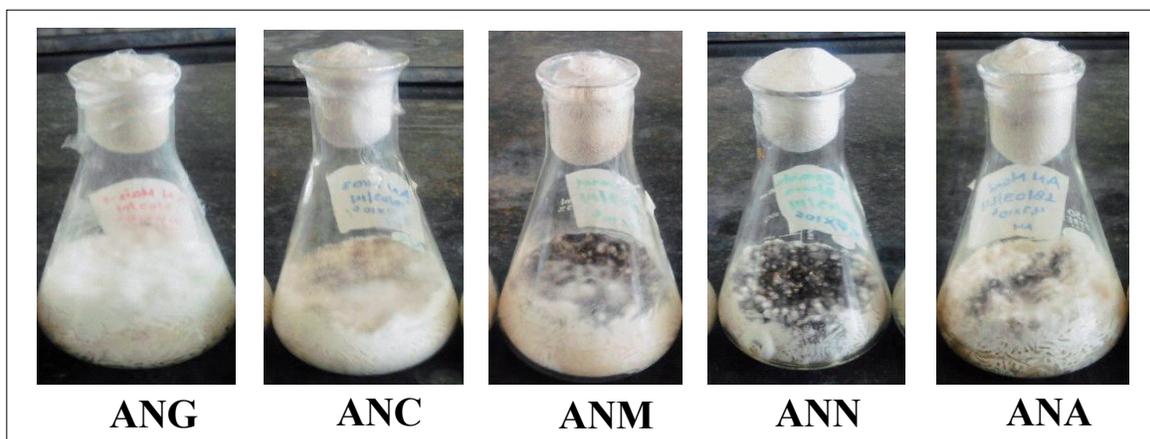


Figura 2. Esporulaci3n de los aislados de *Aspergillus niger* inoculados sobre el medio de arroz durante 15 d1as de incubaci3n a temperatura ambiente. AN: *Aspergillus niger* aislado de G (girasol), C (caraota), M (ma1z), N (man1) y A (arroz).

m1s bajos que los detectados en el presente estudio. Tales variaciones pueden atribuirse a diferencias en las condiciones clim1ticas imperantes en cada localidad, a la susceptibilidad de los genotipos de ma1z utilizados o a la capacidad fumonig1nica de la cepa (Sartori *et al.*, 2015; De la Torre *et al.*, 2014).

La presencia de aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenonas y fumonisinas en cereales como el arroz y el ma1z en diversas partes del mundo, demuestra que estos cereales son sustratos ideales para el crecimiento f1ngico y la consecuente producci3n de micotoxinas, convirti1ndolos en una de las posibles fuentes de contaminaci3n para los seres humanos y animales, ya que forman parte de la dieta diaria de muchos pa1ses (Makun *et al.*, 2011).

A pesar que se ha reportado *A. niger* como uno de los principales contaminantes de semillas de girasol (El-Wakil, 2014), y algunas leguminosas como las caraotas (Embaby y Abdel-Galil, 2006) no se encontraron en la literatura estudios que demuestren su capacidad fumonig1nica en dichos sustratos, siendo este el primer estudio realizado en Venezuela que evidencia la capacidad fumonig1nica de aislados de *A. niger* provenientes de estos sustratos y de ma1z, arroz y man1.

Las fumonisinas son sintetizadas a partir de unidades de acetato para formar un polic1tido lineal dimetilado que se condensa con el amino1cido L-alanina, seguido por reacciones de oxigenaci3n y esterificaci3n (De la Torre *et al.*, 2014). La capacidad que tienen ciertos aislados de *A. niger* de sintetizar fumonisinas se debe a la presencia de un grupo de genes putativos similares a los responsables de la producci3n de fumonisinas en *F. verticillioides*, que conforman el locus FUM. Estos genes codifican las

enzimas involucradas en la s1ntesis de fumonisinas y otras prote1nas que median la secreci3n y la resistencia a las mismas (Frisvad *et al.*, 2007).

A pesar de que *A. niger* carece del tricarboxilato transportador FUM 11 presente en *F. verticillioides*, 1ste tiene la capacidad bioqu1mica para producir el 1cido c1trico y probablemente el 1cido reclutar tricarb1lico a trav1s de la bios1ntesis del 1cido c1trico, siendo la fumonisina una peque1a fracci3n de la salida de los 1cidos org1nicos en una base molar (Frisvad *et al.*, 2007, 2011).

Los contenidos de fumonisinas detectados en el presente estudio coinciden con los reportados en muestras de uvas, donde se han detectado diferentes tipos de fumonisinas del grupo B (B_2 , B_4 y B_6) siendo predominante la fumonisina B_2 con niveles entre 171-7841 ppb (Mogensen *et al.*, 2010). Adem1s, se ha comprobado que algunas cepas de *A. niger* utilizadas en diferentes procesos industriales tuvieron la capacidad de producir fumonisina B_2 , B_4 , B_6 y ocratoxina A. El 83% de los aislamientos produjo fumonisinas, 33% ocratoxinas y un 26% produjo ambas micotoxinas, lo que permite cuestionar el estatus GRAS otorgado por la FDA (Frisvad *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente estudio y en diferentes investigaciones alrededor del mundo constituyen una alerta para la sociedad, ya que las fumonisinas son consideradas como posibles carcin3genos de humanos, que adem1s causan diferentes patolog1as en animales como toxicidad en aves de corral, edema pulmonar en porcinos, leucoencefalomalacia en equinos, c1ncer de h1gado en ratas, mutagenecidad y c1ncer en primates, retardo en el crecimiento y otros (Dowling,

1997; Norred y Voss, 1994). Aunado a esto, el hecho de que *A. niger* es uno de los contaminantes más comunes en diversos productos alimenticios como uvas, granos de café verde, maíz, maní, arroz, cebolla, mango, frutos secos, entre otros y además es ampliamente utilizado en la industria en diferentes procesos biotecnológicos gracias a su estatus GRAS, representa un gran riesgo para la salud tanto pública como animal (Frisvad et al. 2007, 2011).

Por lo tanto, es necesario continuar con las investigaciones en otros productos alimenticios donde *A. niger* sea uno de los contaminantes habituales y realizar una caracterización biomolecular en cepas de uso industrial, con la finalidad de garantizar que las mismas sean completamente atoxigénicas y no representen un riesgo para el producto final.

CONCLUSIONES

Se aisló e identificó *A. niger* a partir de granos de maní y caraota comercial distribuidos en Maracay, estado Aragua. Todos los aislados de *A. niger* tuvieron la capacidad de producir fumonisinas, lo que representa un gran riesgo para la salud a nivel mundial, ya que es un contaminante habitual de diversos sustratos y algunas cepas son utilizadas industrialmente en diferentes procesos biotecnológicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por los aportes financieros que hicieron posible la investigación. Así mismo, reconocen la valiosa colaboración del Dr. Mario José Garrido en la revisión del manuscrito y el apoyo del Laboratorio de Raíces y Tubérculos de la Facultad de Agronomía, UCV y el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chavarri, M.; C. Mazzani; O. Luzón; C. González; J. Alezones; M. Garrido. 2009. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Ven.* 22: 2 – 7.
- Chavarri, M.; C. Mazzani; O. Luzón; M. Garrido. 2012. Detección de hongos toxigénicos en harinas de maíz precocidas distribuidas en el estado Aragua, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 32: 126 – 130.
- De la Torre, M.; Sánchez, D.; Galeana, E. y Plasencia, J. 2014. Fumonisinas – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* – maíz. *Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 17(1): 77 – 91.
- Dowling, T. 1997. Fumonisin and its toxic effects. *Cereal Foods World.* 42: 13 – 15.
- El-Wakil, D. 2014. Seed-borne fungi of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their Impact on oil quality. *J. Agr. Vet. Sci.* 6: 38 – 44.
- Embaby, E.; M. Abdel-Galil. 2006. Seed borne fungi and mycotoxins associated with some legume seeds in Egypt. *J. App. Sci. Res.* 2: 1064-1071.
- Frisvad, J.; J. Smedsgaard; R. Samson; T. Larsen; U. Thrane. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9727–9732.
- Frisvad, J.; T. Larsen; U. Thrane; M. Meijer; J. Varga; R. Samson; K. Nielsen. 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE* 6: e23496.
- Grau, C.; D. Muñoz; E. Márquez; G. Figueroa; J. Maza. 2011. Identificación de hongos con potencial micotoxigénico en harinas de pescado destinadas para la elaboración de alimentos concentrados. *Rev. Cien. Fac. Cien. Vet. LUZ.* 21(3): 256-264.
- Homsí, W. 2002. Producción de fumonisinas *in vitro* por cepas nativas de *Fusarium moniliforme* aisladas de maíz procedente de tres estados de Venezuela. Trabajo de Grado. Fac. Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 54 p.
- Logrieco, A.; M. Haidukowski; A. Susca; G. Mulé; G. Munkvold; A. Moretti. 2014. *Aspergillus* section *Nigri* as contributor of fumonisin B2 contamination in maize. *Food Add. Cont. Part A.* 31: 149 – 155.
- Makun, H.; M. Dutton; P. Njobeh; M. Mwanza; A. Kabiru. 2011. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotox Res.* 27: 97–104.
- Mazzani, E.; O. Borges; O. Luzón; V. Barrientos; P. Quijada. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Ven.* 12: 9 – 13.
- Mazzani, C.; O. Luzón; M. Chavarri; M. Fernández; N. Hernández. 2008. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. *Fitopatol. Ven.* 21: 18-22.

- Mazzani, E. 2012. Caracterización química y micotoxicológica de genotipos de maní confiteros en dos localidades de Venezuela. Trabajo de Grado. Fac. Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 154 p.
- Mogensen, J.; J. Frisvad; U. Thrane; K. Nielsen. 2010. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. J. Agric. Food Chem. 58: 954 – 958.
- Mogensen, J. 2011. Significance and occurrence of fumonisins from *Aspergillus niger*. Trabajo de Grado Ph.D. Dep. Systems Biology, Technical University of Denmark. Lyngby, Dinamarca. 170 p.
- Narcise, R. 2009. Mohos toxigénicos y aflatoxinas asociadas a granos de carota, frijol y lenteja y capacidad aflatoxigénica *in vitro* de los aislamientos de *Aspergillus flavus* en Venezuela. Trabajo de Grado M.Sc. Fac. Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 126 p.
- Norred, W.; K. Voss. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot. 57: 522 – 527.
- Unión Europea. 2006. Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. L364: 5-14.
- Palencia, E.; D. Hinton; C. Bacon. 2010. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. Toxins. 2: 399 – 416.
- Palma, A. 1996. Micobiota fúngica e producao de aflatoxinas e fumonisina por cepas de *Aspergillus flavus* Link e *Fusarium moniliforme* Sheldon de tres híbridos de graos de milho recién- colhido. Trabajo de Grado M.Sc. Universidade de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil. 105 p.
- Paramee, N.; W. Mahakarnchanakul; K. Nielsen; J. Frisvad; R. Samson. 2009. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from Thai coffee beans. Food Add. Cont. 26: 94 – 100.
- Samson, R.; E. Hoekstra; J. Frisvad; O. Filtenborg. 1995. Introduction a food-borne fungi. 4^{ta} ed. Centralabureau voor Schimmelcultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Wageningen, Países Bajos. 322 p.
- Sartori, M.; A. Nesci, M. Etcheverry. 2015. Infección de *Fusarium verticillioides* y contenidos de fumonisinas en granos de maíz de plantas con inflorescencias femeninas cubiertas y no cubiertas. Rev. Fac. Cien. Agra Univ. Nac. Cuyo 47(1): 251 – 261.
- Scott, P.; M. Trucksess. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. J. AOAC Int. 80: 941-949.
- Singh, K.; J. Frisvad; U. Thrane; S. Mathur. 1991. An illustrated manual on identification of seed-borne *Aspergilli*, *Fusarium*, *Penicillia* and their mycotoxins. Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Odense, Dinamarca. 133 p.
- Soares, C.; T. Calado; A. Venancio. 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. Rev. Iberoam. Micol. 30: 9-13.
- SPSS. 2008. SPSS Statistics for Windows. Ver. 17.0. SPSS Inc. Chicago, EUA.
- Trucksess, M. 1996. Evaluation and application of immunochemical methods for fumonisin B₁ in corn. In Beier, R.C.; L.H. Stanker (Eds.) Immunoassays for Residue Analysis: Food Safety. ACS Symposium Series 621. Washington, EUA. pp. 326 - 332.